

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21720061152226

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

流感病毒 H1 亚型血凝素单抗库的构建及其  
抗原性变异分析

Establishment of Monoclonal Antibodies Panel against  
Haemagglutinin of H1 Subtype influenza virus and Analysis  
of its antigenic variation

李 国 强

指导教师姓名: 张 军 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 月

论文答辩日期: 2009 年 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2009 年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 摘 要

H1N1 流感病毒是重要的人类季节性流感病毒，历史上曾引发两次全球大流行，而 2009 年春季开始全球流行的甲型 H1N1 流感病毒再次使 H1N1 流感病毒成为全球关注的热点。血凝素（HA）是流感病毒编码蛋白中与抗原性相关的最主要的蛋白，与病毒的传播、毒力、抗原性等密切相关，所以本研究选择以 HA 作为主要靶标来研究 H1N1 流感病毒的变异规律，以期为 H1N1 流感病毒的疫苗和治疗研究提供有用信息。

首先，通过摸索流感病毒的采集标本和培养病毒对 MDCK 细胞的最佳感染条件，确定了一个通用的流感病毒分离和培养系统。经过长期的病毒分离工作，建立了一个包含 62 株病毒的 H1N1 流感病毒库，为后续研究奠定了工作基础。

其次，利用分子进化树分析方法对 1995-2009 年间分离的 118 株 H1N1 流感病毒血凝素基因进行抗原性预测，根据病毒所处进化分支位置的不同，将目前 H1N1 病毒流行株分为 Clade 0-4 等五类。根据病毒所处的进化分支位置的不同，选择 20 株 H1N1 病毒代表株用于单抗的制备和鉴定。用 Clade 2、4.2、4.6、4.1 及禽类 H1N1 等五种不同变异分支的 H1N1 病毒为免疫原，建立了一个由 52 株单抗组成的 H1 亚型血凝素特异性单抗库。用血凝抑制试验方法（HI）分析 H1 单抗库对 20 株 H1N1 病毒代表株的血凝抑制活性，结果单抗可分为六类（M1-M6）。从中挑选出 14 株代表性单抗组成单抗盘（H1 MAb Panel）用于 H1N1 流感病毒的抗原性分析。结果显示这些单抗的细胞中和活性和血凝抑制活性基本一致，根据反应性的不同，14 株单抗大致被分为五类，代表五种不同的表位识别特征（I、II、III、IV、V）。抗原性分析结果还显示，62 株 H1N1 流感病毒可分成四种抗原变异类型（A、B、C 和 D）。根据这一抗原性分类，分析病毒氨基酸位点的差异情况，发现至少有二十处氨基酸位点的突变可能与 H1N1 流感病毒抗原性变异有关，其中 203(RBS)、205(Sb)、206(Sb)和 157（接近 Ca1）是文献报道的 HA 抗原性漂移的关键位点。总之，本研究成功建立了一个 H1 MAb Panel，可用于监测评估 H1N1 流感病毒的现有流行株和未来出现的新变异株的抗原性变异情况。

最后,利用现有单抗库中 52 株 H1 亚型特异性单抗作为关键原料,建立 H1N1 流感病毒诊断试剂。试剂灵敏度为 0.5 HA, 检出率为 89.5%, 特异性良好, 可用作 H1 亚型流感病毒的特异性诊断。

**关键词:** H1N1; 流感病毒; 血凝素; 单抗; 抗原性; 诊断

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

H1N1 influenza virus is an important seasonal human influenza virus, has historically been a global pandemic twice. The global epidemic of influenza A H1N1 virus become the world's attention once again in spring 2009. Hemagglutinin (HA) which is the most important antigen-related protein, has been related with the spread of the virus, virulence and antigenicity closely. This study chooses HA as a major target to find out variation mechanism of H1N1 influenza virus, with a view to provide useful information for vaccine and treatment research of H1N1 influenza virus.

First of all, a common influenza virus isolation and culture system were developed, and the optimal conditions of virus cultivation has been determined. A bank of 62 H1N1 virus which will lay a basis for the follow-up study has been setting up after long-term work of virus isolation.

Secondly, the antigenic prediction of hemagglutinin gene of 118 H1N1 strains was made by method of phylogenetic tree analysis. Five major clade of H1N1 was determined, and we select 20 strains for the preparation and identification of monoclonal antibody. A panel of 52 H1 HA specific MAb has been established using Clade 2, 4.2, 4.6, 4.1 and an avian strain for immunization, and characterized by HI assay to the 20 H1N1 viruses. According to their HI reactive spectrums, the 52 MAbs can be divided into six categories (M1-M6), and 14 representative MAbs were further selected as a panel to characterize the antigenicity of H1N1 virus. Five groups, I, II, III, IV and V, were identified based on their cross-reactive spectra with this panel of MAbs in neutralisation assay, and four antigenic groups, A, B, C and D, were identified at the same time. At least 20 antigenicity-related amino acid mutation were found out by analysing differences between amino acid sites. Four sites of these, 203 (RBS), 205 (Sb), 206 ( Sb) and 157 (close to Ca1), may play a key role in antigenic drift of H1N1 viruses. In summary, this study established a useful panel of H1 HA

MAbs and will facilitate for the recognition of emerging antigenic variants of H1N1 virus and help in monitoring and evaluating the current H1N1 virus.

Finally, diagnostics were established using the 52 H1 HA specific MAbs. Its sensitivity and detection rate are 0.5 HA and 89.5%, respectively. And its specificity is good. It can be used for diagnostic purposes of H1N1 virus.

**Keywords:** H1N1; Influenza virus; Hemagglutinin; Monoclonal antibody; Antigenicity; Diagnostics

# 目 录

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	III
第一章 前 言 .....	1
1.1 甲型流感病毒概述 .....	2
1.1.1 流感病毒的分类与命名 .....	2
1.1.2 流感病毒的形态结构与化学组成 .....	2
1.1.3 甲型流感病毒基因组编码蛋白的结构与功能 .....	4
1.1.4 甲型流感病毒的进化 .....	12
1.2 流感病毒的诊断 .....	16
1.2.1 传统诊断技术 .....	16
1.2.2 分子诊断技术 .....	17
1.2.3 快速诊断技术 .....	17
1.3 H1N1 流感病毒流行现状 .....	18
1.3.1 全球性大流感(Pandemic Influenza) .....	18
1.3.2 2009 年甲型H1N1 (A/H1N1) 流感大流行 .....	21
1.3.3 H1N1 流感病毒的流行特点 .....	25
1.4 本论文的研究意义和主要研究内容 .....	26
第二章 材料与方法 .....	27
2.1 主要仪器 .....	27
2.2 主要耗材 .....	28
2.3 主要试剂与实验动物 .....	28
2.4 常用溶液和培养基的配制 .....	30
2.5 实验方法 .....	34
第三章 结果与分析 .....	48



<b>3.1 流感病毒库的建立</b>	<b>48</b>
3.1.1 流感病毒细胞培养条件的优化	48
3.1.2 H1N1 流感病毒的分离和培养	52
3.1.3 本节小结	54
<b>3.2 H1 亚型血凝素单抗库的构建</b>	<b>54</b>
3.2.1 H1N1 流感病毒的分子进化分析	54
3.2.2 H1 亚型流感病毒代表株 (H1N1 Virus Panel) 的选择	58
3.2.3 单毒株免疫和多毒株免疫的不同效果	58
3.2.4 H1 亚型血凝素单抗盘 (H1 MAB Panel) 的建立	61
3.2.5 本节小结	62
<b>3.3 H1N1 流感病毒的抗原性变异规律</b>	<b>64</b>
3.3.1 应用H1 单抗盘 (H1 MAB Panel) 分析H1N1 流感病毒的抗原性	64
3.3.2 H1N1 流感病毒的抗原性漂移规律分析	70
3.3.3 本节小结	71
<b>3.4 H1 亚型血凝素单抗的诊断应用</b>	<b>73</b>
<b>第四章 讨 论</b>	<b>79</b>
4.1 流感病毒的复制周期	79
4.2 H1N1 流感病毒的免疫规律	80
4.3 H1 亚型血凝素单抗盘的应用	80
4.4 H1N1 流感病毒的抗原性漂移	81
4.5 H1 诊断试剂的建立及意义	83
4.6 未来的工作	83
<b>结 论</b>	<b>85</b>
<b>参考文献</b>	<b>86</b>
<b>致 谢</b>	<b>94</b>
<b>附 录</b>	<b>95</b>

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>III</b>
<b>Chapter 1: Preface .....</b>	<b>1</b>
1.1 The biological properties of Influenza A Virus.....	2
1.2 The special diagnosis of Influenza virus .....	16
1.3 Prevelence of H1N1 virus .....	18
1.4 The meaning and content of this research .....	26
<b>Chapter2: Materials and Methods .....</b>	<b>27</b>
2.1 Instrument .....	27
2.2 Supplies .....	28
2.3 Reagents and animals .....	28
2.4 Solvents and medium.....	30
2.5 methods .....	34
<b>Chapter3: Results and Analysis.....</b>	<b>48</b>
3.1 Establishment of virus bank .....	48
3.2 H1 monoclonal antibody library.....	54
3.3 Variation of H1N1 virus.....	64
3.4 Monoclonal diagnostic use of H1 MAb .....	73
<b>Chapter4: Discussion.....</b>	<b>79</b>
4.1 The replication cycle of influenza virus .....	79
4.2 Immunization of H1N1 virus .....	80
4.3 Application of H1 MAb Panel.....	80
4.4 Antigenic drift of H1N1 virus.....	81
4.5 The establishment of H1N1 diagnostics and its significance .....	83
4.6 The next work.....	83

<b>Summary.....</b>	<b>85</b>
<b>References.....</b>	<b>86</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>94</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>95</b>

## 第一章 前言

今年爆发的甲型 H1N1 流感病毒大流行，到 5 月 27 日为止，已经造成了 46 个国家和地区的 13,398 人感染，95 人死亡，给人类造成了巨大的经济损失（图 1.1）。WHO 也一度将此次疫情的流感大流行危险评估等级提升到第 5 级（最高为第 6 级）。同时，甲型 H1N1 流感病毒的危害还远没有结束，照以往大流行的经验，还会有第二波流感的大流行，而且第二波会比第一波更加猛烈、更加致命<sup>[1]</sup>。研究 H1N1 流感病毒变异规律可以使我们在较短时间内了解流感病毒变异趋势，迅速采取合理措施。H1N1 流感病毒的相应的诊断试剂的研发，对于即早发现流感病毒感染，控制疾病传播以及让患者即早进行对症治疗具有重要的意义。

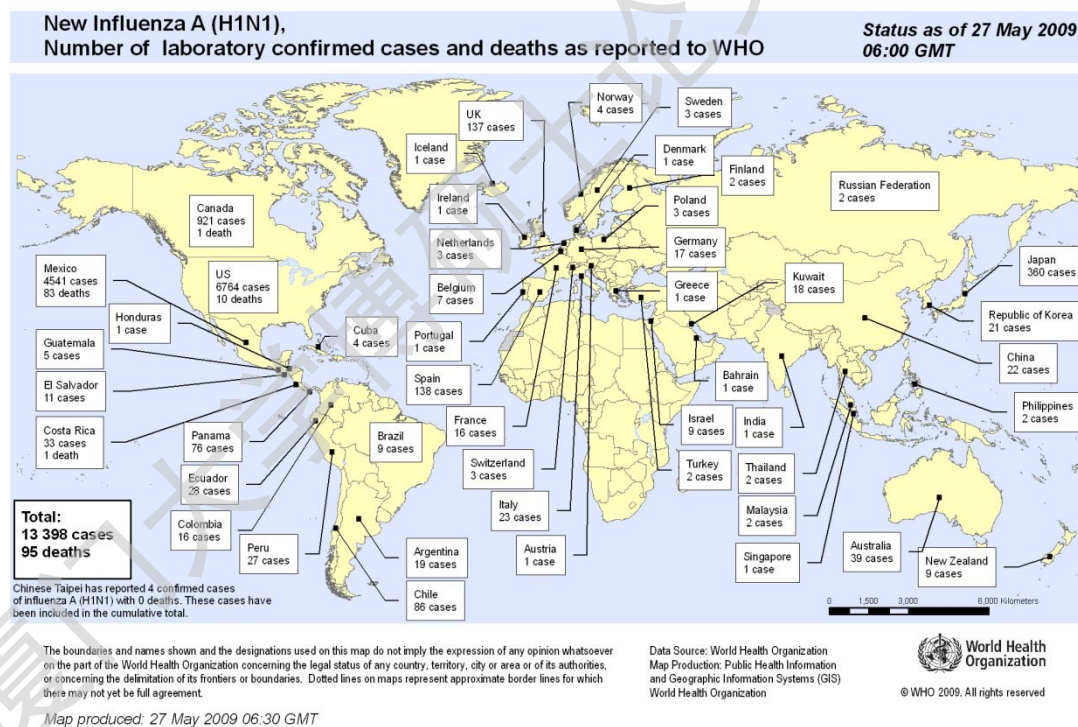


图 1.1 2009 年甲型 H1N1 流感病毒大流行的爆发形势

Fig. 1.1 Situation of A/H1N1 outbreak in 2009

From: WHO website [http://www.who.int/csr/don/2009\\_05\\_27a/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2009_05_27a/en/index.html)

H1N1 流感病毒是一种甲型流感病毒，因此认识甲型流感病毒有助于更好的认识 H1N1 流感病毒。

## 1.1 甲型流感病毒概述

### 1.1.1 流感病毒的分类与命名

流感病毒为正粘病毒科 (*Orthomyxoviridae*)，流感病毒属，单链的负义 RNA 病毒。流感病毒根据核壳蛋白和基质蛋白抗原性的不同可分为甲 (A)、乙 (B)、丙 (C) 三个血清型，其中，只有甲、乙两型流感病毒对人类具有流行病学意义。甲、乙、丙型不仅反映了病毒被发现的年代及前后顺序，更主要的是反映了对人类危害程度的顺序<sup>[2]</sup>。

甲型和乙型流感病毒的主要抗原决定簇是血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA)，它们都是跨膜糖蛋白。根据这些糖蛋白的抗原性差异，甲型流感病毒又可分为 16 种 H 亚型 (H1–H16) 和 9 种 N 亚型 (N1–N9)<sup>[3]</sup>。

国际流感工作会议于 1980 修订了流感病毒的标准命名法<sup>[4]</sup>，规定一株流感病毒的名称为：“型别 (A、B、C) 或 (甲、乙、丙) / 宿主 (若为人，可省略) / 分离地 / 毒株序号 / 分离年代 (H、N)”。宿主是人就不必写出，如：A/Brisbane/59/2007 (H1N1)、A/Moscow/21/99 (H3N2)，见图 1.1。宿主为非生命物质应写出生命物质名称，如湖水等。乙、丙型流感病毒命名无亚型划分。

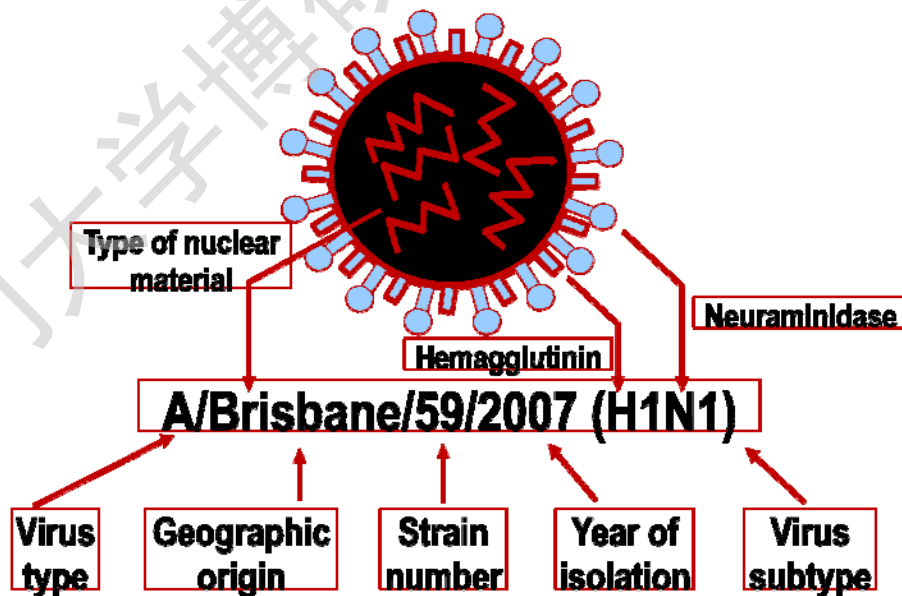


图 1.1 流感病毒命名的图解

Fig.1-1 A schematic diagram of influenza virus

### 1.1.2 流感病毒的形态结构与化学组成

从外部形态上来看，甲、乙型流感病毒的结构基本相同，丙型流感病毒的不同之处在于颗粒表面只有一种刺突蛋白。甲、乙型流感病毒具多种形态，如丝状、杆状，但一般为球形，电镜下病毒颗粒（图 1.2）直径约为  $80\sim 120\text{nm}$ <sup>[5]</sup>。

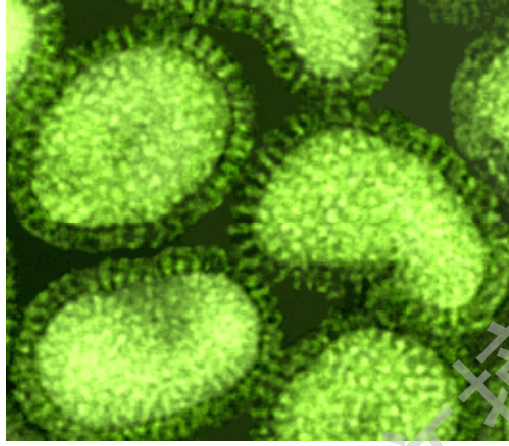


图 1.2 流感病毒颗粒电镜图

**Fig.1-2 The Electron micrographs of influenza virus virions**

Note: Modified from Fields BN et al., Fields' virology. 4th ed. 2001:  
Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

甲型流感病毒的结构主要包括病毒表面的包膜（即病毒囊膜）和病毒内部核心（即核衣壳）两部分。囊膜的表面嵌有 HA 和 NA 两种糖蛋白，比例约为 4:1-5:1。囊膜下面的核衣壳是呈螺旋状对称的，直径约 70nm。病毒的囊膜镶嵌有三种蛋白—HA、NA、M2。囊膜由内向外，分为基质蛋白、类脂和糖蛋白三层。类脂层是脂质双层结构，来自宿主细胞膜或核膜，其中镶嵌的两种糖蛋白 HA 和 NA 向外突出脂质双层形成刺突，构成流感病毒囊膜的最外层：糖蛋白层。在囊膜下面是一层内膜基质蛋白（M1），它介于核蛋白与脂质双层膜之间，与组成脂质双层膜的类脂紧密结合，紧紧地包裹着核衣壳，在维持病毒形状与完整性上起重要作用。病毒核心在电子显微镜下呈电子致密状，主要由 NP 蛋白、RNA 多聚酶（PB1、PB2、PA）等四种核蛋白环绕螺旋状 RNA 形成的核糖蛋白体（RNP，ribonucleoprotein）组成。RNP 中的核酸决定着流感病毒遗传特性的基因组 RNA，在甲、乙型流感病毒中分八个节段，而在丙型病毒中只有七个节段，每一个节段为一个基因，其基因组分节段的特点使其具有了高频率基因重配能力，极易发生变异<sup>[5]</sup>。

流感病毒颗粒由约 1% 的 RNA、70% 的蛋白质、20% 的脂质和 5~8% 的碳水

化合物组成<sup>[5]</sup>。脂质位于病毒的膜内，大部分为磷脂，还有少量的胆固醇和糖脂。几种碳水化合物包括半乳糖、甘露糖、墨角藻糖和氨基葡萄糖和 RNA 内的核糖，它们在病毒粒子中主要以糖蛋白或糖脂的形式存在。

病毒蛋白及潜在的糖基化位点是由病毒基因组所决定的，但组成病毒膜结构的糖蛋白或糖类链的脂质和碳水化合物链的成分，是由宿主细胞确定的。

### 1.1.3 甲型流感病毒基因组编码蛋白的结构与功能

#### 1.1.3.1 病毒基因组

甲型流感病毒的基因组由八条 RNA 片段组成，这八条片段已知可以编码十一种病毒蛋白，即八个结构蛋白（PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2）和两个非结构蛋白（NS1 和 NS2）。根据分子量大小，8 条基因分别为片段 1-8，其中的片断 7 和片段 8 分别各编码两种蛋白，参见表 1.1 和图 1.3<sup>[6]</sup>。近年来有报道认为 PB1 基因的编码产物还可产生一种小肽 PB-F2，可能在诱导宿主细胞凋亡过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。

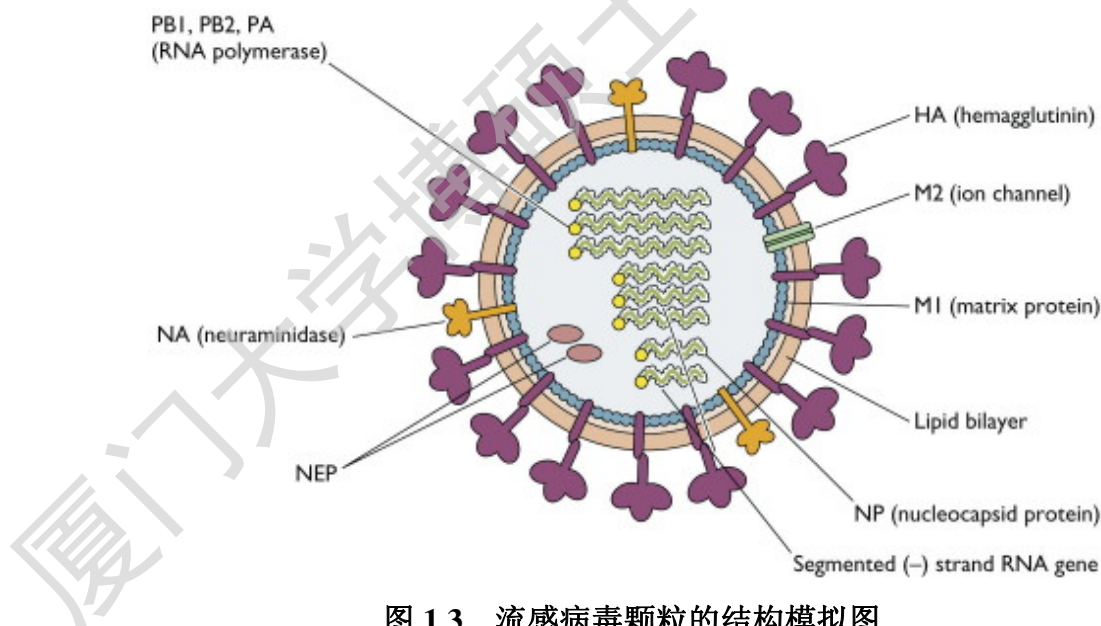


图 1.3 流感病毒颗粒的结构模拟图

Fig. 1.3 The structure of the influenza virus particle

Note: Modified from website:

<http://www.virology.ws/2009/04/30/structure-of-influenza-virus/>

流感病毒的 RNA 片断有如下特点：（1）所有片段的 5'端有 10–13 个相同的核苷酸，序列为 GGAACAAAGUGA-5'；（2）所有片段的 3'端有 12 个高度保守的核苷酸，序列为 3'-UCGUUU-UCGUCC，靠近 3'端的第 4 个碱基为 U 或 C；（3）5'端 15–21 核苷酸处还有一保守区，是由 5–7 个碱基组成的 Poly U 序列，是病毒 mRNA 合成终止时产生 Poly A 的信号<sup>[6]</sup>。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库